

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-243949

(43)Date of publication of application : 14.09.1999

(51)Int.Cl.

C12N 9/04  
C12N 1/21  
C12N 9/96  
C12N 15/09  
// (C12N 9/04  
C12R 1:19 )  
(C12N 1/21  
C12R 1:19 )  
(C12N 15/09  
C12R 1:01 )

(21)Application number : 10-050817

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 03.03.1998

(72)Inventor : TAKESHIMA SEIJI  
HATTORI SHIZUO  
KAWAMURA YOSHIHISA  
ADACHI KAZUO  
MATSUSHITA KAZUNOBU

(54) GLUCOSE DEHYDROGENASE HAVING PQQ AS PROSTHETIC GROUP AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new glucose dehydrogenase producible in a mass at a low cost by gene recombination technique and useful for the determination of blood sugar level, etc.

SOLUTION: This enzyme is (A) a protein composed of the amino acid sequence described by formula or (B) a protein composed of the amino acid sequence of formula provided that one or several amino acid sequences are deleted, substituted or added and having glucose dehydrogenase activity. The glucose dehydrogenase having PQQ as prosthetic group is produced by culturing a PQQ-producing transformed microorganism obtained by transforming a microorganism such as Pseudomonas aeruginosa with a recombinant vector integrated with a DNA fragment containing a gene coding for the enzyme.

Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Thr Thr Leu Leu Gly Ala Ala Gln  
1 5 10 15  
Leu Phe Thr Thr His Thr Ala Phe Ala Asp Lys Phe Leu Thr Phe Ala  
20 25 30  
Thr Asp Thr Ala Gly Asp Val Gln Lys Asn Asp Gly Ser Val Thr His  
35 40 45  
Tyr Ser Gly Asn Thr Gly Ser Lys Phe Thr Tyr Ala Gly Lys  
45 50 55 60

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-243949

(43) 公開日 平成11年(1999) 9月14日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I
C 1 2 N 9/04		C 1 2 N 9/04 D
1/21		1/21
9/96		9/96
15/09	Z N A	15/00 Z N A A
// (C 1 2 N 9/04		

審査請求 未請求 請求項の数34 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-50817

(22) 出願日 平成10年(1998) 3月3日

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 竹嶋 誠嗣

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 服部 静夫

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 川村 良久

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P Q Qを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼおよびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 遺伝子組換え技術により、低コストでしかも多量のP Q Qを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼを提供する。

【解決手段】 P Q Qを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組換えベクターによりP Q Q生産能を有する微生物を形質転換することによって得られた形質転換体を培養し、該培養物から採取されるP Q Qを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼおよびその製造方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)または(b)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項2】 配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ。

【請求項3】 以下の(e)または(f)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ。

(e) 配列表・配列番号3に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(f) アミノ酸配列(e)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項4】 配列表・配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ。

【請求項5】 以下の(a)または(b)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項6】 配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

【請求項7】 以下の(c)または(d)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

(c) 配列表・配列番号2に記載された塩基配列からなるDNA

(d) 上記(c)の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項8】 配列表・配列番号2に記載される塩基配列からなるDNAを有するPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

【請求項9】 以下の(e)または(f)のタンパク質

であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

(e) 配列表・配列番号3に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(f) アミノ酸配列(e)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項10】 配列表・配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

【請求項11】 以下の(g)または(h)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

(g) 配列表・配列番号4に記載された塩基配列からなるDNA

(h) 上記(g)の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードしているDNA

【請求項12】 配列表・配列番号4に記載される塩基配列からなるDNAを有するPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

【請求項13】 請求項5〜12のいずれかに記載のPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項14】 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片が組み込まれ、かつPQQ生産能を有する微生物において複製できることを特徴とする請求項13記載の組換えベクター。

【請求項15】 請求項13または14に記載の組換えベクターでPQQ生産能を有する微生物を形質転換した形質転換体。

【請求項16】 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼがアシネトバクター・カルコアセチカス(*Acinetobacter calcoaceticus*)もしくはアシネトバクター・バウマンニ(*Acinetobacter baumannii*)由来である請求項15記載の形質転換体。

【請求項17】 PQQ生産能を有する微生物がシュードモナス(*Pseudomonas*)属またはアシネトバクター(*Acinetobacter*)属に属する微生物である請求項15記載の形質転換体。

【請求項18】 PQQ生産能を有する微生物がシュードモナス・エルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス・フルオレッセンス(*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)、アシネトバクター・カルコアセチカス(*Acinetobacter calcoaceticus*)、アシネトバクター・バウマ

ンニ (*Acinetobacter baumannii*) からなる群より選ばれた微生物である請求項 15 記載の形質転換体。

【請求項 19】 PQQ 生産能を有する微生物がシュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) である請求項 17 記載の形質転換体。

【請求項 20】 PQQ 生産能を有する微生物がアシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) もしくはアシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) である請求項 17 記載の形質転換体。

【請求項 21】 PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが可溶性である請求項 19 または 20 に記載の形質転換体。

【請求項 22】 PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含む DNA 断片を組込んでなる組換えベクターで PQQ 生産能を有する微生物が形質転換された形質転換微生物を培養して、該培養物から PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼを採取するグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 23】 PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼがアシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) もしくはアシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) 由来の微生物である請求項 22 記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 24】 PQQ 生産能を有する微生物がシュードモナス (*Pseudomonas*) 属またはアシネトバクター (*Acinetobacter*) 属に属する微生物である請求項 23 記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 25】 PQQ 生産能を有する微生物がシュードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス・フルオレッセンシス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、アシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*)、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) からなる群より選ばれた微生物である請求項 23 記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 26】 PQQ 生産能を有する微生物がシュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) である請求項 23 記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 27】 PQQ 生産能を有する微生物がアシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) もしくはアシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) である請求項 23 記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 28】 PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが可溶性である請求項 26 または 27 に記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

10

20

30

40

50

【請求項 29】 PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼを GOOD の緩衝液の存在下に凍結乾燥して保持することを特徴とするグルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法。

【請求項 30】 カルシウムが共存する請求項 29 記載のグルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法。

【請求項 31】 GOOD の緩衝液が PIPES、MES、MOPS からなる群より選ばれた緩衝液である請求項 30 または 31 に記載のグルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法。

【請求項 32】 PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼを GOOD の緩衝液の存在下に凍結乾燥して保持されたものであることを特徴とする安定化されたグルコースデヒドロゲナーゼ組成物。

【請求項 33】 カルシウムが共存する請求項 32 記載のグルコースデヒドロゲナーゼ組成物。

【請求項 34】 GOOD の緩衝液が PIPES、MES、MOPS からなる群より選ばれた緩衝液である請求項 32 または 33 に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、PQQ を補欠分子族とする新規なグルコースデヒドロゲナーゼ（以下、GDH とも言う）、該 GDH をコードする遺伝子、該 GDH をコードする遺伝子断片を組み込んでなる組換えベクター、該組換えベクターで PQQ 生産能を有する微生物が形質転換された形質転換体、該形質転換体を培養することによる GDH の製造方法、GDH の安定化方法ならびに該安定化方法により安定化された GDH 組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】GDH は、1959 年にノルウェーの J. G. Hauge によって未知のキノン化合物を有する酵素として発見された。一方、PQQ (Pyrrolo Quinoline Quinone) は脱水素酵素の第三の補酵素として、1979 年にその化学構造が決定されており、メタノール酸化性菌のメタノール脱水素酵素や酢酸菌のアルコール脱水素酵素やグルコース脱水素酵素を中心に、多くの生物において、主として脱水素酵素でその存在が確認されている。

【0003】これらの脱水素酵素は人工電子受容体を選元できるので、ニトロブルーテトラゾリウムのような色素を用いると可視光で、しかも感度よく検出できると、および NAD 依存性脱水素酵素のように平衡反応ではなく一方向への反応であるので、微量の化合物の定量に極めて有用であるとされている（鮎山実、Methods in Enzymol. 第 89 巻、20 (1982)）。

【0004】PQQ を補欠分子族とする酵素の中で最も有用性が高いのは、PQQ 依存性 GDH であり、血糖の測定に用いることができる。実際の使用に関しては、通

常の生化学試薬としての使用はもちろん、膜に固定したドライ試薬の呈色反応やチップに固定したセンサー用途等幅広く応用することが可能である。グルコースに同様に作用するグルコースオキシダーゼやNAD(P)依存性GDHと比較し、溶存酸素の影響を受けないことや、反応がシンプルなためデバイスを簡単に、しかも安価にできることが特徴である。

【0005】上記PQQを補欠分子族とするGDHのクローニングはアシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) LMD79.41 (A.-M. Cleton-Jansenら, J. Bacteriol., 170, 2121 (1988)) およびMol. Gen. Genet., 217, 430 (1989))、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) (A.-M. Cleton-Jansenら, J. Bacteriol., 172, 6308 (1990))、グルコンバクター・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) (Mol. Gen. Genet., 229, 206 (1991)) 等で報告されており、大腸菌での発現も確認されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】遺伝的によく解析されており、かつ形質転換する宿主として最適化されている大腸菌をはじめとする腸内細菌はPQQを産生しないことが知られており、もしPQQを補欠分子族とするGDHをコードする遺伝子断片を組み込んでなるベクターで大腸菌を形質転換し、該大腸菌を培養しても活性のないアポ型GDHしか得られないことが知られている。これらのアポ型GDHは外からPQQを加えることにより活性のあるホロ型GDHに変換可能であるが、必要とするPQQは試薬として非常に高価である。また、工業的スケールでは全てのアポ型がホロ型に変換されないことが

【0007】また、Biotechnol. Lett., 16, 12, 1265 (1994) には形質転換大腸菌を培養する際、培地にPQQを加えて活性のあるホロ型GDHを生産することが報告されているが、この場合も高価なPQQを多量に用いる必要がある。さらに、Mol. Gen. Genet., 229, 206 (1991) には、グルコンバクター・オキシダンスのGDHをコードする遺伝子断片をグルコンバクター・オキシダンス自身の染色体に組み込んで発現させているが、この場合は染色体上に存在し、多コピーではないため発現量は小さい。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記目的を達成するために種々検討した結果、PQQを補欠分子族とするGDHをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組換えベクターによりPQQ生産能を有する微生物を形質転換することによって得られた形質転換微生物を培養し、該培養物からPQQを補欠分子族とするGDHを採取することによって、安価にGDHを大量生産できることを見出し、本発明に到達した。

【0009】すなわち、本発明は、PQQを補欠分子族とするGDHをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組換えベクターでPQQ生産能を有する微生物を形質転換することによって得られることを特徴とする形質転換微生物を、培養して培養物からPQQを補欠分子族とするGDHを採取することと特徴とするGDHの製造方法である。

【0010】本発明は、以下の(a)または(b)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼである。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

本発明は、配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼである。

【0011】本発明は、以下の(e)または(f)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼである。

(e) 配列表・配列番号3に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(f) アミノ酸配列(e)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

本発明は、配列表・配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼである。

【0012】本発明は、以下の(a)または(b)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

本発明は、配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

【0013】本発明は、以下の(c)または(d)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

(c) 配列表・配列番号2に記載された塩基配列からなるDNA

(d) 上記(c)の配列において、1もしくは数個の塩

基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA

本発明は、配列表・配列番号 2 に記載される塩基配列からなる DNA を有する P Q Q を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

【0014】本発明は、以下の (e) または (f) のタンパク質である P Q Q を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

(e) 配列表・配列番号 3 に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(f) アミノ酸配列 (e) において、1 もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

本発明は、配列表・配列番号 3 に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質である P Q Q を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

【0015】本発明は、以下の (g) または (h) のタンパク質である P Q Q を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

(g) 配列表・配列番号 4 に記載された塩基配列からなる DNA

(h) 上記 (g) の配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードしている DNA

本発明は、配列表・配列番号 4 に記載される塩基配列からなる DNA を有する P Q Q を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

【0016】本発明は、上記 P Q Q を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含む組換えベクターである。本発明は、P Q Q を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含む DNA 断片が組み込まれ、かつ P Q Q 生産能を有する微生物において複製できることを特徴とする上記組換えベクターである。

【0017】本発明は、上記の組換えベクターで P Q Q 生産能を有する微生物を形質転換した形質転換体である。本発明は、P Q Q を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼがアシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) もしくはアシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) 由来である上記形質転換体である。本発明は、P Q Q 生産能を有する微生物がシュードモナス (*Pseudomonas*) 属またはアシネトバクター (*Acinetobacter*) 属に属する微生物である上記形質転換体である。

【0018】本発明は、P Q Q 生産能を有する微生物がシュードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginos*)

a)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、アシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*)、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) からなる群より選ばれた微生物である上記形質転換体である。本発明は、P Q Q 生産能を有する微生物がシュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) である上記形質転換体である。本発明は、P Q Q 生産能を有する微生物がアシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) もしくはアシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) である上記の形質転換体である。本発明は、P Q Q を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが可溶性である上記形質転換体である。

【0019】本発明は、P Q Q を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含む DNA 断片を組込んでなる組換えベクターで P Q Q 生産能を有する微生物が形質転換された形質転換微生物を培養して、該培養物から P Q Q を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼを採取するグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。

【0020】本発明は、P Q Q を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼがアシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) もしくはアシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) 由来の微生物である上記のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。本発明は、P Q Q 生産能を有する微生物がシュードモナス (*Pseudomonas*) 属またはアシネトバクター (*Acinetobacter*) 属に属する微生物である上記グルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。

【0021】本発明は、P Q Q 生産能を有する微生物がシュードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginos*) a)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、アシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*)、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) からなる群より選ばれた微生物である上記グルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。本発明は、P Q Q 生産能を有する微生物がシュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) である上記グルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。本発明は、P Q Q 生産能を有する微生物がアシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) もしくはアシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) である上記グルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。本発明は、P Q Q を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが可溶性である上記グルコースデヒドロゲナーゼの製造方法であ

る。

【0022】本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをGOODの緩衝液の存在下に凍結乾燥して保持することを特徴とするグルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法である。本発明は、カルシウムが共存する上記グルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法である。本発明は、GOODの緩衝液がPIPES、MES、MOPSからなる群より選ばれた緩衝液である上記グルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法である。

【0023】本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをGOODの緩衝液の存在下に凍結乾燥して保持されたものであることを特徴とする安定化されたグルコースデヒドロゲナーゼ組成物である。本発明は、カルシウムが共存する上記のグルコースデヒドロゲナーゼ組成物である。本発明は、GOODの緩衝液がPIPES、MES、MOPSからなる群より選ばれた緩衝液である上記のグルコースデヒドロゲナーゼ組成物である。

#### 【0024】

【発明の実施の形態】本発明のPQQを補欠分子族とするGDHをコードする遺伝子を含むDNA断片は、GDH生産菌より得ることができる。該GDH生産菌として、具体的には、例えばアシネトバクター・カルコアセティカス、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*)、シュードモナス・エルギノサ (*Pseudomonasaeruginosa*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、グルコノバクター・オキシダンス等の酸化細菌やアグロバクテリウム・ラジオバクター (*Agrobacterium radiobacter*)、エシェリヒア・コリ、クレブシエラ・エロジエンズ (*Klebsiella aerogenes*) 等の腸内細菌を挙げることができる。なかでも、アシネトバクター・カルコアセティカスもしくはアシネトバクター・バウマンニの可溶性GDHが好ましい。

【0025】該GDHをコードする遺伝子はこれらの菌株より抽出してもよく、また化学的に合成することもできる。さらに、PCR法の利用により、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片を得ることも可能である。

【0026】上記GDHをコードする遺伝子としては、例えば(a)配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子、または(b)アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が挙げられる。

【0027】また、(e)配列表・配列番号3に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子、または(f)アミノ酸配列(e)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子も挙げることができる。

【0028】さらに、(c)配列表・配列番号2に記載された塩基配列からなるDNA、または(d)上記(c)の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードしているDNAがある。

【0029】さらに、(g)配列表・配列番号4に記載された塩基配列からなるDNA、または(h)上記(g)の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードしているDNAがある。

【0030】本発明において、GDHをコードする遺伝子を得る方法としては、次のような方法が挙げられる。例えばアシネトバクター・カルコアセティカスNCIB11517の染色体を分離、精製した後、超音波処理、制限酵素処理等を用いてDNAを切断したものと、リニアな発現ベクターと両DNAの平滑末端または付着末端においてDNAリガーゼなどにより結合閉鎖させて組換えベクターを構築する。該組換えベクターを複製可能な宿主微生物に移入した後、ベクターのマーカと酵素活性の発現を指標としてスクリーニングして、PQQを補欠分子族とするGDHをコードする遺伝子を含有する組換えベクターを保持する微生物を得る。

【0031】次いで、上記組換えベクターを保持する微生物を培養して、該培養微生物の菌体から該組換えベクターを分離、精製し、該発現ベクターからGDHをコードする遺伝子を取り出すことができる。例えば、遺伝子供与体であるアシネトバクター・カルコアセティカスNCIB11517の染色体DNAは、具体的には以下のようにして採取される。

【0032】該遺伝子供与微生物を例えば1〜3日間攪拌培養して得られた培養液を遠心分離により集菌し、次いで、これを溶菌させることによりPQQを補欠分子族とするGDH遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌の方法としては、例えばリゾチーム等の溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼや他の酵素やラウリル硫酸ナトリウム(SDS)等の界面活性剤が併用される。さらに、凍結融解やフレンチプレス処理のような物理的破碎方法と組み合わせてもよい。

【0033】上記のようにして得られた溶菌物からDNAを分離精製するには、常法に従って、例えばフェノー



ル処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理や、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

【0034】微生物から分離、精製されたDNAを切断する方法は、例えば超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができる。好ましくは特定のヌクレオチド配列に作用するII型制限酵素が適している。

【0035】クローニングする際のベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、例えばエシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合にはLambda gt10、Lambda gt11などが例示される。また、プラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pBR322、pUC19、pBluescriptなどが例示される。

【0036】クローニングの際、上記のようなベクターを、上述したGDHをコードする遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素で切断してベクター断片を得ることができるが、必ずしも該微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同一の制限酵素を用いる必要はない。微生物DNA断片とベクターDNA断片とを結合させる方法は、公知のDNAリガーゼを用いる方法であればよく、例えば微生物DNA断片の付着末端とベクター断片の付着末端とのアニーリングの後、適当なDNAリガーゼの使用により微生物DNA断片とベクターDNA断片との組換えベクターを作成する。必要に応じて、アニーリングの後、宿主微生物に移入して生体内のDNAリガーゼを利用し組換えベクターを作製することもできる。

【0037】クローニングに使用する宿主微生物としては、組換えベクターが安定であり、かつ自律増殖可能で外来性遺伝子の形質発現できるものであれば特に制限されない。一般的には、エシェリヒア・コリW3110、エシェリヒア・コリC600、エシェリヒア・コリHB101、エシェリヒア・コリJM109、エシェリヒア・コリDH5 $\alpha$ などを用いることができる。

【0038】宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合には、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。

【0039】上記のように得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量のGDHを安定に生産し得る。宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカーとPQQの添加によりGDH活性を同時に発現する微生物を検索すればよい。例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつGDHを生成する微生物を選択すればよい。

【0040】上記の方法により得られたPQQを補欠分

子族とするGDH遺伝子の塩基配列は、Science, 第214巻, 1205(1981)に記載されたジデオキシ法により解読した。また、GDHのアミノ酸配列は上記のように決定された塩基配列より推定した。

【0041】上記のようにして、一度選択されたPQQを補欠分子族とするGDH遺伝子を保有する組換えベクターより、PQQ生産能を有する微生物にて複製できる組換えベクターへの移入は、GDH遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素やPCR法によりGDH遺伝子であるDNAを回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによるPQQ生産能を有する微生物の形質転換は、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。

【0042】PQQ生産能を有する微生物としては、メチロバクテリウム(Methylobacterium)属等のメタノール酸化性細菌、アセトバクター(Acetobacter)属やグルコノバクター(Gluconobacter)属の酢酸菌、フラボバクテリウム(Flavobacterium)属、シュードモナス属、アシネトバクター属等の細菌を挙げることができる。なかでも、シュードモナス属細菌とアシネトバクター属細菌が利用できる宿主ベクター系が確立されており利用しやすいので好ましい。

【0043】シュードモナス属細菌では、シュードモナス・エルギノサ、シュードモナス・フルオレッセンシス、シュードモナス・プチダなどを用いることができる。また、アシネトバクター属細菌ではアシネトバクター・カルコアセティカス、アシネトバクター・バウマンニ等を用いることができる。

【0044】上記微生物にて複製できる組換えベクターとしては、RSF1010由来のベクターもしくはその類似のレプリコンを有するベクターがシュードモナス属細菌に利用可能である。例えば、pKT240、pMMB24等(M. M. Bagdasarian ら, Gene, 26, 273(1983))、pCN40、pCN60等(C. C. Nieto ら, Gene, 87, 145(1990))やpTS1137等を用いることができる。また、pME290等(Y. Itoh ら, Gene, 36, 27(1985))、pNI111、pNI20C(N. Itoh ら, J. Biochem., 110, 614(1991))も利用できる。

【0045】アシネトバクター属細菌では、pWM43等(W. Minas ら, Appl. Environ. Microbiol., 59, 2807(1993))、pKT230、pWH1266等(M. Hunger ら, Gene, 87, 45(1990))がベクターとして利用可能である。

【0046】形質転換体である宿主微生物の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

【0047】培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては

10

20

30

40

50



資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、ラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

【0048】培養温度は菌が育成し、GDHを生産する範囲で適宜変更し得るが、上記のようなPQQ生産能を有する微生物の場合、好ましくは20〜42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、GDHが最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を完了すればよく、通常は12〜72時間程度である。培地のpHは菌が発育し、GDHを生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH6.0〜9.0程度の範囲である。

【0049】培養物中のGDHを生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従って、GDHが培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、GDH含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。GDHが菌体内に存在する場合には、得られた培養物からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また、必要に応じて、EDTA等のキレート剤及び界面活性剤を添加してGDHを可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0050】上記のようにして得られたGDH含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるいはゲルろ過剤などによるゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを行うことにより、精製されたGDHを得ることができる。

【0051】例えば、セファデックス (Sephadex) ゲル (ファルマシアバイオテク) などによるゲルろ過、DEAEセファロースCL-6B (ファルマシアバイオテク)、オクチルセファロースCL-6B (ファルマシアバイオテク) 等のカラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。該精製酵素標品は、電気泳動 (SDS-PAGE) 的に単一のバンドを示す程度に純化されていることが好ましい。

【0052】上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥、真空乾燥やスプレードライなどにより粉

末化して流通させることが可能である。その際、精製酵素はリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液やGOODの緩衝液に溶解しているものを用いることができる。好適なものはGOODの緩衝液であり、なかでも、PIPES、MESもしくはMOPS緩衝液が特に好ましい。また、カルシウムイオンまたはその塩、およびグルタミン酸、グルタミン、リジン等のアミノ酸類、さらに血清アルブミン等を添加することによりGDHをより安定化することができる。

10 【0053】本発明のPQQを補欠分子とするGDHの一例は、以下に示すような理化学的性質を有する。

作用：D-グルコース + 人工電子受容体 →  $\delta$ -グルコノラクトン + 還元型電子受容体

熱安定性：約50℃以下 (pH7.5、30分間処理)

pH安定性：3.5〜8.5 (25℃、16時間処理)

至適温度：約40℃

至適pH：7.0

分子量：50000

20 【0054】本発明において、補欠分子族とするGDH活性の測定は以下の条件で行う。

【0055】＜試薬＞

50mM PIPES緩衝液 (pH6.5)

0.2mM PMS

0.2mM NTB

30.6mM グルコース

0.19% トリトンX-100

30 【0056】＜測定条件＞上記試薬混液3mlを37℃で約5分予備加温後、0.1mlの酵素溶液を加え、緩やかに混和後、水を対照に37℃に制御された分光光度計で5分間記録し、その直線部分から1分間あたりの吸光度変化を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様に吸光度変化を測定する。上記条件で1分間に1/2  $\mu$ molのジホルマゼンを生成する酵素量を1単位 (U) とする。

【0057】

【実施例】以下、実施例により、本発明を具体的に説明する。

実施例1：染色体DNAの分離

40 アシネトバクター・カルコアセチカスNCIB11517の染色体DNAを次の方法で分離した。同菌株を100mlのLB培地で30℃、一晚振とう培養した後、遠心分離 (8000rpm、10分間) により集菌した。20%シュクロース、50mMトリス/塩酸緩衝液 (pH7.6)、1mM EDTAを含んだ溶液5mlに懸濁し、1mlのプロティナーゼK溶液 (100mg/ml) を加えて37℃、30分間保温し、次いで、1mlの10%ラウロイルサルコシナトリウム溶液を加えた。

50 【0058】上記溶液に等量のクロロホルム・フェノール溶液 (1:1) を加え、攪拌混合し、10000rpm

m、3 分間の遠心で水層と溶媒層に分け、水層を分取した。該水層に 2 倍量のエタノールを静かに重層し、ガラス棒でゆっくり攪拌しながら DNA をガラス棒に巻き付かせて分離した。これを 1 mM EDTA を含んだトリス/塩酸緩衝液 (pH 8.0; 以下、TE と略記する) で溶解した。これを等量のクロロホルム・フェノール溶液で処理後、遠心分離により水層を分取し、2 倍量のエタノールを加えて、上記方法で再度 DNA を分離し、2 ml の TE で溶解した。

【0059】実施例 2: PQQ を補欠分子族とする可溶性 GDH をコードする遺伝子を含有する DNA 断片及び該 DNA 断片を有する組換えベクターの調製

実施例 1 で得た DNA 5  $\mu$ g を制限酵素 Sau3AI (東洋紡績製) で部分分解し、2 kb p 以上の断片にした後、BamHI (東洋紡績製) で切断した pBluescript KS(+) 1  $\mu$ g と T4 DNA リガーゼ (東洋紡績製) 1 単位で 16  $^{\circ}$ C、16 時間反応させ、DNA を連結した。連結した DNA はエシェリヒア JM109 のコンピテントセル (東洋紡績製) を用いて形質転換した。使用した DNA 1  $\mu$ g 当たり約  $10^5$  個の形質転換体のコロニーが得られた。

【0060】次いで、得られたコロニーは 50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含んだ LB 培地で 30  $^{\circ}$ C、24 時間培養し、リゾチーム破碎後、PQQ を添加し、該粗酵素液の可溶性 GDH 活性を測定した。その結果、1 株の PQQ を補欠分子族とする GDH 生産株を見出した。該菌株の保有するプラスミドには約 8 kb p の挿入 DNA が存在しており、該プラスミドを pPGH1 とした。

【0061】該プラスミド DNA 5  $\mu$ g を制限酵素 MboI (東洋紡績製) で切断してアガロースゲル電気泳動を行ない、可溶性 GDH 遺伝子を含む長さ約 1.9 kb の断片を切り出した。単離した DNA と EcoRV (東洋紡績製) で切断した pBluescript KS(+) 1  $\mu$ g とを T4 DNA リガーゼ 1 単位で 16  $^{\circ}$ C、16 時間反応させ、DNA を連結した。連結した DNA はエシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られたコロニー中に GDH 遺伝子を有するプラスミドを有するコロニーを見出し、該プラスミドを pPGH2 と命名した。

【0062】実施例 3: 塩基配列の決定  
pPGH2 の挿入 DNA 断片について常法に従い、デリーションミュータントを調製した。種々のサブクローンは常法に従い、シーケンシング・キット (Radioactive Sequencing Kit) (東洋紡績製) を用いて塩基配列を決定した。決定した塩基配列およびアミノ酸配列は配列番号 1 および 2 に示す通りである。アミノ酸配列から求められる蛋白質の分子量は約 52800 であり、アシネトバクター・カルコアセティカス NCIB11517 の GDH の分子量とほぼ一致した。

【0063】実施例 4: アシネトバクター・バウマンニ JCM6841 の可溶性 GDH の塩基配列の決定

アシネトバクター・バウマンニ JCM6841 の染色体 DNA を実施例 1 と同様の方法で分離し、PQQ を補欠分子族とする可溶性 GDH をコードする遺伝子を含有する DNA 断片及び該 DNA 断片を有する組換えベクターの調製を実施例 2 と同様に実施し、約 7 kb p の挿入断片を有する pPGH6 を取得した。該プラスミドより GDH をコードする遺伝子を含有する DNA 断片を含む 4 kb の DNA 断片を常法により、サブクローニングして pPGH7 を構築した。

【0064】次に、pPGH7 の挿入 DNA 断片について常法に従いデリーションミュータントを調製した。種々のサブクローンは常法に従い、シーケンシング・キット

(Radioactive Sequencing Kit) (東洋紡績製) を用いて塩基配列を決定した。決定した塩基配列およびアミノ酸配列は配列番号 3 および 4 に示す通りである。アミノ酸配列から求められる蛋白質の分子量は約 53000 であり、アシネトバクター・バウマンニ JCM6841 の GDH の分子量とほぼ一致した。

【0065】実施例 5: シュードモナス属細菌で複製できる発現ベクターの構築

実施例 3 で得たプラスミド DNA 5  $\mu$ g を制限酵素 BamHI および XhoI (東洋紡績製) で切断して、GDH 遺伝子を含む長さ 1.9 kb の断片を含む DNA を単離した。単離した DNA と BamHI および XhoI で切断した pTS1137 を 1  $\mu$ g とを T4 DNA リガーゼ 1 単位で 16  $^{\circ}$ C、16 時間反応させ、DNA を連結した。連結した DNA はエシェリヒア・コリ DH5  $\alpha$  のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られたコロニー中に GDH 遺伝子を有するプラスミドを有するコロニーを見出し、該プラスミドを pGLD3 と命名した。

【0066】実施例 6: アシネトバクター属細菌で複製できる発現ベクターの構築

実施例 3 で得たプラスミド DNA 5  $\mu$ g を制限酵素 MboI (東洋紡績製) で切断して、GDH 遺伝子を含む長さ 1.9 kb の断片を含む DNA を単離した。単離した DNA と MscI (東洋紡績製) で切断した pWH1266 を 1  $\mu$ g とを T4 DNA リガーゼ 1 単位で 16  $^{\circ}$ C、16 時間反応させ、DNA を連結した。連結した DNA はエシェリヒア・コリ DH5  $\alpha$  のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られたコロニー中に GDH 遺伝子を有するプラスミドを有するコロニーを見出し、該プラスミドを pGLD4 と命名した。

【0067】比較例 1: エシェリヒア・コリ宿主用発現ベクターの構築

実施例 3 で得たプラスミド DNA 5  $\mu$ g を制限酵素 MboI (東洋紡績製) で切断して、GDH 遺伝子を含む長さ 1.8 kb の断片を含む DNA を単離した。単離した DNA と EcoRV で切断した pBluescript KS(+) 1  $\mu$ g とを T4 DNA リガーゼ 1 単位で 16  $^{\circ}$ C、16 時間反応させ、DNA を連結した。連結した DNA はエシェリヒア

10

20

30

40

50

・コリJM109 のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られたコロニー中にGDH遺伝子を有するプラスミドを有するコロニーを見出し、該プラスミドをpGLD5 と命名した。

【0068】比較例2：エシェリヒア・コリJM109 /pGLD5 からのPQQを補欠分子族とするGDHの製造  
Terrific broth 500 ml を2 Lフラスコに分注し、121℃、15分間オートクレーブを行い、放冷後、別途無菌ろ過した50 mg/mlアンピシリン0.5 mlを添加した。該培地にLB培地で予め、30℃、24時間振とう培養したエシェリヒア・コリJM109 /pGLD5の培養液5 mlを接種し、37℃で24時間通気攪拌培養した。培養終了時のGDH活性は約0.34 U/mlであった。一方、活性測定試薬に10 μmolのPQQを添加後、活性測定すると120 U/mlであった。

【0069】実施例7：PQQ生産能を有する微生物の形質転換体の作製

シュードモナス・プチダTE3493（微工研寄12298号）をLBG培地（LB培地+0.3%グリセロール）で30℃、16時間培養し、遠心分離（12000 rpm、10分間）により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300 mMシュウクロースを含む5 mM K-リン酸緩衝液（pH7.0）8 mlを加え、菌体を懸濁した。再度遠心分離（12000 rpm、10分間）により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300 mMシュウクロースを含む5 mM K-リン酸緩衝液（pH7.0）0.4 mlを加え、菌体を懸濁した。

【0070】該懸濁液に実施例5で得たプラスミドDNA（pGLD3）0.5 μgを加え、エレクトロポレーション法により形質転換した。50 μg/mlストレプトマイシンを含んだLB培地に生育したコロニーより、PQQを補欠分子族とする可溶性GDH活性を有するクローンを得た。

【0071】同様に、上記pGLD3を用いて、シュードモナス・プチダTN1126株、シュードモナス・エルギノサPA01162株、シュードモナス・フルオレッセンシIF012568株より形質転換体を取得した。

【0072】また、アシネトバクター・カルコアセチカスNCIB11517をLB培地で30℃、16時間培養し、遠心分離（12000 rpm、10分間）により菌体を回収し、この菌体に氷冷した滅菌水8 mlを加え、菌体を懸濁した。再度遠心分離（12000 rpm、10分間）により菌体を回収し、該菌体に10%グリセロール0.4 mlを加え、菌体を懸濁した。

【0073】該懸濁液50 μlに実施例6で得たプラスミドDNA（pGLD4）0.5 μgを加え、エレクトロポレーション法により形質転換した。テトラサイクリン50 μg/mlを含んだLB培地に生育したコロニーより、PQQを補欠分子族とする可溶性GDH活性を有するクローンを得た。

【0074】実施例8：得られた形質転換体によるGDH活性発現量の比較

実施例7で得られた5種の形質転換体、比較例2で得られた形質転換体および対照としてアシネトバクター・カルコアセチカスNCIB11517をTerrific broth 50 ml（1.2%ポリペプトン、2.4%酵母エキス、0.4%NaCl、17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、72 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH7.0）で30℃、24時間培養し、遠心分離（12000 rpm、3分間）により菌体を回収した。該菌体を1 mMのCaCl<sub>2</sub>を含んだ50 mMトリス/塩酸緩衝液、pH7.5に懸濁後、超音波により菌体を破碎した。遠心分離（12000 rpm、5分間）によって菌体残さを除去した、粗酵素液を調製後、GDH活性を測定した。その結果を表1に示す。

【0075】実施例9：シュードモナス・プチダTE3493/pGLD3からのPQQを補欠分子族とするGDHの製造  
Terrific broth 500 ml を2 Lフラスコに分注し、121℃、15分間オートクレーブを行い、放冷後、別途無菌ろ過した50 mg/mlストレプトマイシン0.5 mlを添加した。該培地にLB培地で予め、30℃、24時間振とう培養した実施例7で得られたシュードモナス・プチダTE3493/pGLD3の培養液5 mlを接種し、37℃で48時間通気攪拌培養した。培養終了時のGDH活性は約45 U/mlであった。

【0076】上記菌体を遠心分離にて集菌し、20 mMリン酸緩衝液、pH7.0に懸濁した。該菌体懸濁液をフレンチプレスで破碎後、遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。該粗酵素液をポリエチレンジオキサンによる除核酸処理および硫酸分画処理を行った後、セファデックスG-25（ファルマシアバイオテク）によるゲルろ過により脱塩し、CMセファロース（ファルマシアバイオテク）、フェニルセファロース（ファルマシアバイオテク）カラムクロマトグラフィーにより分離、精製して、精製酵素標品を得た。

【0077】上記の方法により得られたGDH標品は電気泳動（SDS-PAGE）的にほぼ単一のバンドを示し、この際の比活性は約2100 U/mgタンパク質であった。

【0078】以下に、上記方法により得られたPQQを補欠分子族とするGDHの性質を示す。

作用：D-グルコース + 人工電子受容体 → δ-グルコノラクトン + 還元型電子受容体

熱安定性：約50℃以下（pH7.5、30分間処理）

pH安定性：3.5～8.5（25℃、16時間処理）

至適温度：約40℃

至適pH：7.0

分子量：50000

【0079】上記菌体を遠心分離にて集菌し、20 mMリン酸緩衝液（pH7.0）に懸濁した。該菌体懸濁液をフレンチプレスで破碎後、遠心分離を行い、上清液を

粗酵素液として得た。該粗酵素液をポリエチレンイミンによる除核酸処理および硫酸分画処理を行った後、セファデックス G-25 (ファルマシアバイオテク) によるゲルろ過により脱塩し、CMセファロース (ファルマシアバイオテク)、フェニルセファロース (ファルマシアバイオテク) カラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得た。

【0080】本方法により得られた GDH 標品は電気泳動 (SDS-PAGE) 的にほぼ単一のバンドを示し、この際の比活性は約 85 U/mg タンパク質であつた。

この酵素を 1 mM の  $\text{CaCl}_2$  および  $10 \mu\text{mol}$  \*

形質転換体によるグルコースデヒドロゲナーゼ活性発現量

\* の PQQ 存在下、37℃、1 時間インキュベートした後、比活性を測定したが、約 460 U/mg タンパク質に過ぎなかった。

【0081】実施例 10: GDH の粉末化

1 mM の  $\text{CaCl}_2$  および BSA (GDH 1.0 重量部に対して 1.0 重量部) を含む各種緩衝液中に溶解した実施例 9 の GDH を凍結乾燥した後、37℃における GDH 活性の残存性を測定した。その結果を表 2 に示す。

【0082】

【表 1】

形質転換体	活性発現量 (U/ml)
<i>P. putida</i> TE3493/pGLD3	43
<i>P. putida</i> TN1126/pGLD3	26
<i>P. aeruginosa</i> PAO1162/pGLD3	30
<i>P. fluorescens</i> IF012568/pGLD3	27
<i>A. calcoaceticus</i> NCIB11517/pGLD4	22
<i>B. coli</i> JM109/pGLD5 (比較例 2)	0.23
<i>A. calcoaceticus</i> NCIB11517 (対照)	1.6

培養液 1 ml 当たりの酵素活性

【0083】

※30※【表 2】

グルコースデヒドロゲナーゼ粉末の安定性

緩 衝 液	残存活性 (%)	
	凍結乾燥直後	37℃, 3 日間
トリス塩酸, pH 7.5	98.6	38.8
PIPES, pH 6.5	99.8	101.0
MES, pH 6.5	102.0	99.6
MOPS, pH 6.5	99.2	52.4
HEPES, pH 7.0	101.0	28.3

凍結乾燥前のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を 100 とする

【0084】

【発明の効果】上述したように、本発明において、PQQ を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが単離された。また、PQQ 生産能を有する微生物を用いた

宿主一ベクター系を利用する遺伝子工学技術により、PQQ を補欠分子族とする GDH の製造方法が確立された。本発明の製造方法によれば、高純度な PQQ を補欠分子族とする GDH を安価に効率よく生産することが可

能である。

【0085】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：480

配列の型：アミノ酸

\* トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

起源

生物名：アシネトバクター・カルコアセティカス (Acinetobacter calcoaceticus)

\* 株名：NCIB 11517

配列

```

Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Thr Leu Leu Gly Ala Ala Gln
  1           5           10           15
Leu Phe Thr Phe His Thr Ala Phe Ala Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala
          20           25           30
Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr Glu Asn Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu
      35           40           45
Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln
      50           55           60
Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro
      65           70           75           80
Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Ser
          85           90           95
Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp
          100          105          110
Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro
          115          120          125
Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr
          130          135          140
Thr Tyr Asn Lys Thr Thr Asp Thr Phe Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile
          145          150          155          160
Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile
          165          170          175
Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn
          180          185          190
Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr
          195          200          205
Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val
          210          215          220
Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Val Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe
          225          230          235          240
Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln
          245          250          255
Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly
          260          265          270
Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Val Leu Lys Gly Gly Asn Tyr
          275          280          285
Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr
          290          295          300
Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala
          305          310          315          320
Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser
          325          330          335
Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr

```

23 340 345 350  
 Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala  
 355 360 365  
 Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr  
 370 375 380  
 Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro  
 385 390 395 400  
 Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr  
 405 410 415  
 Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg  
 420 425 430  
 Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu  
 435 440 445  
 Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr His  
 450 455 460  
 Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys  
 465 470 475 480

【0086】配列番号：2

配列の長さ：1 4 4 3

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムDNA

\* 起源

生物名：アシネトバクター・カルコアセティカス (Acin

20 etobacter calcoaceticus )

株名：NCIB 11517

\*

配列

ATG AAT AAA CAT TTA TTA GCA AAA ATC ACT CTT TTA GGT GCT GCA CAA 48  
 Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Thr Leu Leu Gly Ala Ala Gln  
 1 5 10 15  
 CTA TTT ACG TTT CAT ACG GCA TTT GCA GAT ATA CCT CTG ACA CCT GCT 96  
 Leu Phe Thr Phe His Thr Ala Phe Ala Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala  
 20 25 30  
 CAG TTC GCA AAA GCG AAA ACA GAA AAT TTT GAT AAA AAA GTG ATT CTG 144  
 Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr Glu Asn Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu  
 35 40 45  
 TCC AAT TTA AAT AAA CCA CAT GCT TTG TTA TGG GGG CCA GAT AAT CAA 192  
 Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln  
 50 55 60  
 ATT TGG TTA ACC GAA CGT GCA ACT GGC AAA ATT TTA AGA GTA AAT CCT 240  
 Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro  
 65 70 75 80  
 GTA TCT GGT AGC GCG AAA ACA GTA TTT CAG GTT CCT GAA ATT GTG AGT 288  
 Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Ser  
 85 90 95  
 GAT GCT GAT GGG CAA AAT GGT TTG TTA GGT TTT GCT TTT CAT CCT GAC 336  
 Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp  
 100 105 110  
 TTT AAA CAT AAC CCT TAT ATC TAT ATT TCA GGC ACT TTT AAA AAT CCA 384  
 Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro  
 115 120 125  
 AAA TCT ACA GAT AAA GAG TTA CCT AAT CAG ACG ATT ATT CGT AGA TAT 432  
 Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr  
 130 135 140

25  
 ACC TAT AAT AAA ACT ACA GAT ACA TTT GAA AAG CCT ATT GAT TTG ATT 480  
 Thr Tyr Asn Lys Thr Thr Asp Thr Phe Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile  
 145 150 155 160  
 GCA GGT TTA CCG TCA TCA AAA GAT CAT CAG TCT GGT CGT CTC GTT ATT 528  
 Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile  
 165 170 175  
 GGT CCA GAC CAA AAA ATC TAC TAT ACG ATT GGT GAC CAA GGT CGT AAT 576  
 Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn  
 180 185 190  
 CAG TTA GCT TAT CTG TTC TTA CCG AAT CAG GCA CAG CAT ACT CCG ACT 624  
 Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr  
 195 200 205  
 CAG CAA GAG CTC AAT AGT AAA GAC TAC CAT ACA TAT ATG GGT AAA GTA 672  
 Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val  
 210 215 220  
 TTA CGC TTA AAT CTG GAC GGC AGT GTA CCT AAA GAC AAC CCA AGC TTT 720  
 Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Val Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe  
 225 230 235 240  
 AAC GGC GTA GTG AGT CAT ATC TAC ACT TTA GGC CAC CGT AAT CCA CAA 768  
 Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln  
 245 250 255  
 GGT TTA GCA TTT GCC CCA AAT GGA AAG CTT TTA CAA TCT GAG CAA GGA 816  
 Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly  
 260 265 270  
 CCA AAT TCT GAT GAT GAA ATT AAC CTT GTA TTA AAA GGT GGT AAC TAT 864  
 Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Val Leu Lys Gly Gly Asn Tyr  
 275 280 285  
 GGC TGG CCA AAT GTA GCT GGT TAT AAA GAT GAC AGT GGT TAT GCC TAT 912  
 Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr  
 290 295 300  
 GCA AAC TAT TCG GCA GCA ACC AAT AAA TCA CAA ATT AAA GAT TTA GCT 960  
 Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala  
 305 310 315 320  
 CAA AAC GGG ATA AAA GTA GCA ACA GGT GTT CCT GTG ACT AAA GAG TCT 1008  
 Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser  
 325 330 335  
 GAA TGG ACT GGT AAA AAC TTT GTG CCG CCT TTG AAA ACT TTA TAT ACG 1056  
 Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr  
 340 345 350  
 GTA CAA GAT ACC TAT AAC TAT AAT GAC CCT ACT TGT GGT GAG ATG GCA 1104  
 Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala  
 355 360 365  
 TAT ATT TGC TGG CCA ACG GTT GCA CCG TCA TCA GCA TAT GTA TAT ACG 1152  
 Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr  
 370 375 380  
 GGA GGC AAA AAA GCG ATT CCA GGG TGG GAA AAT ACA TTA TTG GTC CCA 1200  
 Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro  
 385 390 395 400  
 TCT TTA AAA CGT GGC GTG ATT TTC CGT ATT AAA TTG GAC CCG ACA TAT 1248  
 Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr



(15)

特開平 1 1 - 2 4 3 9 4 9

27

28

405 410 415  
 AGC ACG ACT TTG GAT GAT GCT ATC CCA ATG TTT AAA AGC AAT AAC CGT 1296  
 Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg  
 420 425 430  
 TAT CGT GAT GTC ATC GCT AGT CCA GAA GGT AAT ACC TTA TAT GTG CTG 1344  
 Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu  
 435 440 445  
 ACT GAT ACA GCG GGG AAT GTA CAA AAA GAT GAT GGT TCT GTC ACT CAT 1392  
 Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr His  
 450 455 460  
 ACT TTA GAG AAT CCC GGT TCT CTC ATT AAA TTT ACA TAT AAC GGT AAG 1440  
 Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys  
 465 470 475 480  
 TAA 1443

【0087】配列番号：3

\* 起源

配列の長さ：480

生物名：アシネトバクター・バウマンニ (Acinetobacter baumannii)

配列の型：アミノ酸

株名：JCM6841

トポロジー：直鎖状

\*

配列の種類：蛋白質

配列

Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Thr Leu Leu Gly Ala Ala Gln  
 1 5 10 15  
 Leu Phe Thr Phe His Thr Ala Phe Ala Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala  
 20 25 30  
 Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr Glu Asn Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu  
 35 40 45  
 Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln  
 50 55 60  
 Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro  
 65 70 75 80  
 Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Ser  
 85 90 95  
 Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp  
 100 105 110  
 Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro  
 115 120 125  
 Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr  
 130 135 140  
 Thr Tyr Asn Lys Thr Thr Asp Thr Phe Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile  
 165 170 175  
 Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn  
 180 185 190  
 Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Ser Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr  
 195 200 205  
 Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val  
 210 215 220  
 Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe  
 225 230 235 240

ATG	AAT	AAA	CAT	TTA	TTA	GCA	AAA	ATC	ACT	CTT	TTA	GGT	GCT	GCA	CAA	48
Met	Asn	Lys	His	Leu	Leu	Ala	Lys	Ile	Thr	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Gln	
1				5				10						15		
CTA	TTT	ACG	TTT	CAT	ACG	GCA	TTT	GCA	GAT	ATA	CCT	CTG	ACA	CCT	GCT	96
Leu	Phe	Thr	Phe	His	Thr	Ala	Phe	Ala	Asp	Ile	Pro	Leu	Thr	Pro	Ala	
				20				25						30		
CAG	TTC	GCA	AAA	GCG	AAA	ACA	GAA	AAT	TTT	GAT	AAA	AAA	GTG	ATT	CTG	144
Gln	Phe	Ala	Lys	Ala	Lys	Thr	Glu	Asn	Phe	Asp	Lys	Lys	Val	Ile	Leu	
				35				40						45		
TCC	AAT	TTA	AAT	AAA	CCA	CAT	GCT	TTG	TTA	TGG	GGG	CCA	GAT	AAT	CAA	192
Ser	Asn	Leu	Asn	Lys	Pro	His	Ala	Leu	Leu	Trp	Gly	Pro	Asp	Asn	Gln	
				50				55						60		
ATT	TGG	TTA	ACC	GAA	CGT	GCA	ACT	GGC	AAA	ATT	TTA	AGA	GTA	AAT	CCT	240
Ile	Trp	Leu	Thr	Glu	Arg	Ala	Thr	Gly	Lys	Ile	Leu	Arg	Val	Asn	Pro	

31	70	75	80
65	70	75	80
GTA TCT GGT AGC GCG AAA ACA GTA TTT CAG GTT CCT GAA ATT GTG AGT 288			
Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Ser			
85	90	95	
GAT GCT GAT GGG CAA AAT GGT TTG TTA GGT TTT GCT TTT CAT CCT GAC 336			
Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp			
100	105	110	
TTT AAA CAT AAC CCT TAT ATC TAT ATT TCA GGC ACT TTT AAA AAT CCA 384			
Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro			
115	120	125	
AAA TCT ACA GAT AAA GAG TTA CCT AAT CAG ACA ATT ATT CGT ACA TAT 432			
Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr			
130	135	140	
ACC TAT AAT AAA ACT ACA GAT ACA TTT GAA AAG CCT ATT GAT TTG ATT 480			
Thr Tyr Asn Lys Thr Thr Asp Thr Phe Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile			
145	150	155	160
GCA GGT TTA CCG TCA TCA AAA GAT CAT CAG TCT GGT CGT CTC GTT ATT 528			
Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile			
165	170	175	
GGT CCA GAC CAA AAA ATC TAC TAT ACG ATT GGT GAC CAA GGT CGT AAT 576			
Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn			
180	185	190	
CAG TTA GCT TAT CTA TTC TTA TCG AAT CAG GCA CAG CAT ACT CCG ACT 624			
Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Ser Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr			
195	200	205	
CAG CAA GAG CTC AAT AGT AAA GAC TAC CAT ACA TAT ATG GGT AAA GTA 672			
Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val			
210	215	220	
TTA CGC TTA AAT CTG GAC GGC AGT ATA CCT AAA GAC AAC CCA AGC TTT 720			
Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe			
225	230	235	240
AAC GGC GTA GTG AGT CAT ATC TAC ACT TTA GGC CAC CGT AAT CCA CAA 768			
Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln			
245	250	255	
GGT TTA GCA TTT GCC CCA AAT GGA AAG CTT TTA CAA TCT GAG CAA GGG 816			
Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly			
260	265	270	
CCA AAT TCT GAT GAT GAA ATT AAC CTT GTA TTA AAA GGT GGT AAC TAT 864			
Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Val Leu Lys Gly Gly Asn Tyr			
275	280	285	
GGC TGG CCA AAT GTA GCT GGT TAT AAA GAT GAC ACT GGT TAT GCC TAT 912			
Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr			
290	295	300	
GCA AAC TAT TCG GCA GCA ACC AAT AAA TCA CAA ATT AAA GAT TTA GCT 960			
Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala			
305	310	315	320
CAA AAC GGC ATA AAA GTA GCA ACA GGT GTT CCT GTG ACT AAA GAG TCT 1008			
Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser			
325	330	335	
GAA TGG ACT GGT AAA AAC TTT GTG CCA CCT TTG AAA ACT TTA TAT ACG 1056			

特開平 1 1 - 2 4 3 9 4 9

34

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

FI

Z N A

(72)発明者 松下 一信  
山口県山口市吉敷2645-27